

Angiotensiini 2 ja insuliiniresistenssi ihmisen luurankolihasessa

Johannes Kärkkäinen

Helsinki 10.3.2014

Syventävä tutkielma

Ohjaaja: LT, dosentti Heikki Allan Koistinen

HELSINGIN YLIOPISTO

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Kliininen laitos	
Tekijä – Författare – Author Johannes Petteri Kärkkäinen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Angiotensiini 2 ja insuliiniresistenssi ihmisen luurankolihasessa			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Syventävä tutkimusprojekti	Aika – Datum – Month and year 03/2014	Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages 34	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Vähäinen liikunta ja runsaasti energiaa sisältävä ravitsemus ovat aikaansaaneet räjähdysmäisen ylipainon ja lihavuuden yleistymisen. Ylipainoon ja lihavuuteen liittyvät sairaudet, kuten tyypin 2 diabetes mellitus, rasvamaksa, verenpainetauti, sepelvaltimotauti, hyperkolesterolemia, aivoinfarkti ja metabolinen oireyhtymä, ovat merkittäviä sairastavuuden ja ennenaikaisen kuolleisuuden aiheuttajia. Lihavuus ja insuliiniresistenssi ovat tyypin 2 diabetes mellituksen keskeisimmät riskitekijät.</p> <p>Patologinen reniini-angiotensiini-aldosteroni –järjestelmän (RAAS) aktivaatio on keskeisessä roolissa endoteelin toimintahäiriön ja insuliiniresistenssin kehityksessä useissa elimissä. Laajoissa kliinisissä lääketutkimuksissa on tullut esiin ACE-estäjien ja angiotensiini 2:den (AT2) tyypin 1 reseptoria salpaavien lääkeaineiden insuliiniherkkyyttä parantava ja uusia diabetestapauksia vähentävä vaikutus. AT2:den ja insuliinin aineenvaihdunta on monilta osin toisiinsa kietoutunutta ja RAAS-järjestelmällä on keskeinen rooli verenpaineen säätelyn lisäksi myös insuliinin klassisissa kohdekudoksissa.</p> <p>Selvittääksemme AT2:den roolia insuliiniresistenssin synnyssä ihmisen luurankolihasessa tutkimme glukosin kuljetusta 14 terveen koehenkilön vastus lateralis -lihaksesta avolihasbiopsiatekniikalla otetuissa lihasnäytteissä. Tutkimuksemme perusteella AT2:lla on ihmisen luurankolihasoluissa insuliinivälitteistä glukosin soluun kuljetusta vähentävä vaikutus ex vivo. AT2 vähensi glukosin kuljetusta 20 % insuliinin läsnä ollessa, mutta insuliinin puuttuessa AT2:lla ei ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta glukosin kuljetukseen. RAAS-järjestelmä ja AT2 ovat siten mielenkiintoinen kohde pyrittäessä lisäämään lihaksen insuliiniherkkyyttä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Insuliiniresistenssi, angiotensiini 2, luurankolihas			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällysluettelo

Sisällysluettelo	0
Taustaa	4
Ylipaino ja tyypin 2 diabetes mellitus terveystriskinä	4
Tyypin 2 diabeteksen etiologia ja patogeneesi	5
Reniini-angiotensiini-aldosteronijärjestelmä	6
Glukoosin insuliinivälitteinen kuljetus luurankolihasoluun	10
Insuliiniresistenssi luurankolihasessa	15
RAAS ja insuliiniresistenssi	16
Aineisto	18
Menetelmät	21
Kahden tunnin glukoosirasitus	21
Avolihasbiopsia	21
Inkubaatio	22
Näytteiden käsittely	22
Tulokset	24
Pohdintaa	25
Lähdeluettelo	27

Taustaa

Ylipaino ja tyypin 2 diabetes mellitus terveysriskinä

Vähäinen liikunta ja runsaasti energiaa sisältävä ravitsemus ovat aikaansaaneet räjähdysmäisen ylipainon ja lihavuuden yleistymisen. Maailman terveysjärjestön (WHO = World Health Organization) viimeisimpien analyysien mukaan ongelma ei ole väistymässä ja yhä useammin ylipainoiset ja lihavat henkilöt asuvat kehittyvien maiden kaupunkiympäristössä. WHO:n tilastoissa 1.6 miljardia aikuista henkilöä (ikä 15+) oli ylipainoisia ($BMI \geq 25$) ja ainakin 400 miljoonaa oli lihavia ($BMI \geq 30$) vuonna 2005. Vuoteen 2015 ulottuvassa arviossa 2.3 miljardia aikuista tulee olemaan ylipainoisia ja 700 miljoonaa lihavia ¹. Ylipainoon ja lihavuuteen liittyvät sairaudet, kuten tyypin 2 diabetes mellitus (T2D = type 2 diabetes mellitus), rasvamaksa (NAFLD = nonalcoholic fatty liver disease), verenpainetauti (HTA = hypertonia arterialis), sepelvaltimotauti (MCC = morbus coronarius), hyperkolesterolemia, aivoinfarkti ja metabolinen oireyhtymä (MetS = metabolic syndrome), ovat merkittäviä sairastavuuden ja ennenaikaisen kuolleisuuden aiheuttajia.

Diabeteksen maailmanlaajuinen esiintyvyys 20-79 -vuotiailla on arvioitu kasvavan vuoden 2011 8.3 prosentista (366 miljoonaa henkilöä) 9.9 prosenttiin (552 miljoonaa henkilöä) vuoteen 2030 mennessä ². Maailmanlaajuisesti yli yhdeksän kymmenestä diabeetikosta sairastaa T2D:tä ja suurin osa heistä on ylipainoisia ³. Diabeteksesta aiheutuva maailmanlaajuinen kuolleisuus arvioitiin olevan 2.9 miljoonaa henkilöä vuonna 2000 ja 4.6 miljoonaa henkilöä vuonna 2011 ⁴. Ikäryhmässä 20-79 -vuotta puolet diabeetikoista arvioidaan olevan diagnosoimattomia (183 miljoonaa henkilöä) ja diabeteksen hoidon arvioidaan aiheuttavan noin 11 prosenttia terveydenhuollon kustannuksista vuonna 2011 ². Suomessa diabeteksen esiintyvyys oli 45-74 -vuotiailla miehillä 15.7 prosenttia ja naisilla 11.2 prosenttia vuosina 2004-2005 kootussa laajassa aineistossa ⁵ ja myös Suomessa tyypin 2 diabetes on laajalti alidiagnosoitu.

Tyypin 2 diabeteksen etiologia ja patogeneesi

Diabetes mellitukseksi kutsutaan joukkoa aineenvaihdunnan sairauksia, joissa insuliinin erityksen ja/tai insuliinivaikutuksen häiriöt johtavat hyperglykemiaan. Tavallisesti diabetes mellitus jaetaan tyypin 1 diabetekseen ja tyypin 2 diabetekseen. Tyypin 1 diabeteksen aiheuttaa täydellinen insuliinin erityksen puute ja autoimmuniprosessien ajatellaan olevan patogeneesin keskiössä. T2D:lle tyypillisiä piirteitä ovat insuliinin kohde-elinten vähentynyt insuliiniherkkyys eli insuliiniresistenssi ja haiman β -solujen tarpeeseen nähden riittämätön insuliinin erityys. Plasman glukoosipitoisuuden kohoaminen johtaa edelleen diabeteksen kroonisiin mikro- ja makrovaskulaarisiin komplikaatioihin: sydän- ja verisuonisairauksiin, nefropatiaan, neuropatioihin, amputaatioihin ja retinopatiaan. Runsaasti energiaa sisältävä ravitsemus ja vähäinen liikunta johtavat painonnousuun ja kohde-elinten insuliiniresistenssiin. Lihavuus ja insuliiniresistenssi ovat T2D:n keskeisimmät riskitekijät ⁶.

Painonnousun taustalla on monimutkainen geneettisen alttiuden, ympäristötekijöiden ja inhimillisen käyttäytymisen muodostama kokonaisuus. Genotyyppi voi olla altistamassa sekä painonnousulle että insuliiniresistenssille ja mukana näyttäisi olevan genotyyppi-ravitsemus, genotyyppi-fyysinen aktiivisuus ja genotyyppi-käyttäytyminen interaktioita ⁷. Varsinaiset muutokset genomin tasolla ilmenevät liian hitaasti ollakseen selittämässä ihmiskunnan nopeaa painonnousua. Tyypillistä kardiovaskulaaristen riskitekijöiden yhteenliittymää, mukaan lukien insuliiniresistenssi, plasman kohonnut glukoosin paastoarvo (IFG = impaired fasting glucose) ja/tai heikentynyt glukoosin sieto (IGT = impaired glucose tolerance), keskivartalolihavuus, plasman pienentynyt HDL-kolesterolipitoisuus, plasman kohonnut triglyseridipitoisuus ja kohonnut verenpaine, kutsutaan metaboliseksi oireyhtymäksi.

Glukoosiaineenvaihdunnan kannalta keskeisiä kudoksia on useita ja muun muassa ruoansulatuselimistön, maksan, haiman, keskushermoston, rasvakudoksen, verisuoniston ja luurankolihasen tiedetään osallistuvan sekä normaaliin että patologiseen glukoosiaineenvaihduntaan. Kussakin kudoksessa insuliiniresistenssin synnyssä merkittäviä solubiologisia mekanismeja on useita. Luurankolihasessa ainakin haitallisten rasva-aineenvaihdunnan metaboliittien ^{8,9}, inflammaation ¹⁰⁻¹², mitokondrioiden toimintahäiriön ¹³⁻¹⁵, ikääntymisprosessien ^{16,17} ja muuttuneen lihassolutyypin jakauman ¹⁸ tiedetään olevan mukana insuliiniresistenssin synnyssä.

Reniini-angiotensiini-aldosteronijärjestelmä

Reniini-angiotensiini-aldosteronijärjestelmä (RAAS = renin-angiotensin-aldosterone system) osallistuu keskeisesti verenpaineen ja nestetasapainon säätelyyn. Maksan tuottama angiotensinogeeni pilkkoutuu munuaisten tuottaman reniinin katalysoimana angiotensiini I:ksi (AT1 = angiotensin I = angiotensin 1-10). Angiotensiini I pilkkoutuu edelleen angiotensiinia konvertoivan entsyymin (ACE = angiotensin converting enzyme) välittämän reaktion kautta verenkierrossa aktiiviseksi angiotensiini II:ksi (AT2 = angiotensin II = angiotensin 1-8). Sydän- ja verenkiertoelimistössä AT2:den vaikutuksesta pienet valtimosuonet supistuvat, josta seuraa systolisen ja diastolisen verenpaineen nousu. Angiotensiini II on eräs potenteimmista tunnetuista verisuonia supistavista tekijöistä eli vasokonstriktoreista.

Toinen AT2:n keskeisistä systeemisistä vaikutuksista on sen suora vaikutus lisämunuaiskuoren aldosteronin eritykseen. Reniini-angiotensiinijärjestelmä on keskeisin aldosteronin eritystä säätelevä tekijä. AT2:n vaikutuksesta aldosteronin erityks lisääntyy. Aldosteronin vaikutuksesta esimerkiksi natriumin takaisin imeytyminen munuaisissa, sylkirauhasissa ja suolistossa tehostuu ja tämän vaikutuksesta ekstrasellulaarinnesteen määrä kasvaa. AT2:lla on myös suoria vaikutuksia munuaistubulusten natriumin takaisinottoon. AT2:n välillisiä keskushermostotason vaikutuksia ovat

barorefleksiä heikentävä vaikutus, veden nauttimista lisäävä vaikutus sekä ACTH:n ja vasopressiinin eritystä lisäävä vaikutus. AT2 ei läpäise veri-aivoestettä. AT2:n vaikutuksia aineenvaihduntaan käsitellään myöhemmin.

AT2 on siis maksassa tuotettavan angiotensinogeenin aineenvaihduntatuote. Angiotensinogeeni on ihmisellä 453 aminohaposta koostuva esiastemolekyyli, joka kuuluu plasman α -2-globuliinifraktioon. Maksassa se syntetisoidaan 32 aminohaposta koostuvan signaalsekvenssin kanssa, joka poistetaan endoplasmisessa retikkelissä. Verenkierrossa olevan molekyylin painosta hiilihydraatteja on noin 13 %.

Munuaisten jukstaglomerulaarisolujen tuottama reniinientsyymi erottaa angiotensinogeenin aminoterminalisesta päästä dekaeptidi angiotensiini I:n. Reniini tuotetaan suurena preprohormonina. Ihmisellä preproreniini koostuu 406 aminohaposta, josta 23 aminohapon mittaisen signaaliptidin pilkkoutuessa syntyy 383 aminohaposta koostuva proreniini. Proreniiniä erittyy munuaisten lisäksi myös muista elimistä kuten munasarjoista, mutta ainoastaan munuaisessa tuotetaan aktiivista reniiniä. Proreniini ei ole yksinään biologisesti aktiivinen, mutta proreniinin reseptoriinsa kiinnittyminen voi aktivoida molekyylin. Aktiivinen reniini koostuu 340 aminohaposta ja muodostuu kahdesta domeenista, joiden välisessä uurteessa sijaitsee molekyylin aktiivinen kohta. Reniini tuotetaan sekretoriin granuloihin, joiden vapautumista verenkiertoon lisäävät munuaisten sympaattinen aktivaatio, verenpaineen lasku munuaisvaltimoissa ja Na^+ ja Cl^- -pitoisuuksien lasku macula densan alueella. Aktiivisen reniinin biologinen puoliintumisaika on alle 80 minuuttia ja keskeisin tunnettu tehtävä on AT1:n pilkkominen angiotensinogeenista. Aiemmin ajateltiin, että angiotensiinin tuottaminen on reniinin ainoa tehtävä, mutta viime vuosina reniini/proreniinireseptorin löytäminen on muuttanut tätä kuvaa ¹⁹. Reniini on RAAS:in kannalta rajoittava tekijä.

AT1 on kymmenen aminohapon mittainen peptidi Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu, josta ACE pilkkoo aktiivista kahdeksasta aminohaposta

koostuvaa AT2:ta. ACE on dipeptidyylikarboksiptidaasi, joka erottaa AT1:n karboksyyli-terminaalista päästä histidyyli-leusiini-dipeptidin muodostaen aktiivisen AT2:n. Systemisestä AT2 tuotannosta suurin osa tapahtuu endoteelisoluissa erityisesti keuhkoverenkierron alueella, mutta pieni osa systeemisestä ja elinkohtaista AT2 tuotantoa tapahtuu lähes kaikissa elimissä. Keuhkoissa toinen keskeinen ACE:n tehtävä on vasodilaattori bradykiniinin inaktivoiminen. Tämä tapahtuma liittyy erityisesti lääkeaineryhmä ACE-estäjien tavalliseen haittavaikutukseen: bradykiniinin pilkkoutumisen estyessä noin 20 prosentilla ACE-estäjien käyttäjistä esiintyy hankalaa kuivaa yskää bradykiniinireseptorivälitteisesti.

Angiotensiini II:n puoliintumisaika verenkierrossa on vain 1-2 minuuttia. Se pilkkoutuu nopeasti useiden peptidaasien toimesta ja joillakin sen aineenvaihduntatuotteilla tiedetään olevan biologisesti aktiivinen rooli. AT2 hajotetaan edelleen joko heptapeptidi angiotensiini III:ksi (AT3 = angiotensin III = angiotensin 2-8) aminopeptidaasi A (AMPA = aminopeptidase A) pilkkomana tai heptapeptidi angiotensiini 1-7:ksi (AT 1-7 = angiotensin 1-7) angiotensiiniä konvertoivan entsyymi 2:n (ACE2 = angiotensin-convertingenzyme 2) katalysoimassa reaktiossa. AT 1-7 voi muodostua myös toista reittiä siten, että ACE2 pilkkoo AT1:n ensin yhdeksästä aminohaposta koostuvaksi angiotensiini 1-9:ksi, josta edelleen tuotetaan AT 1-7:ta neutraalin endopeptidaasin (NEP = neutralendopeptidase) ja ACE:n avulla. Aminopeptidaasi M (AMPM = aminopeptidase M) hajottaa AT3:n heksapeptidi angiotensiini IV:ksi (AT4 = angiotensin IV = angiotensin 3-8).²⁰

RAAS biologisesti aktiivisia molekyylejä ovat ainakin AT2, AT3, AT4 ja AT 1-7 ja lisäksi proreniinillä ja reniinillä vaikuttaisi olevan angiotensinogeeni-AT1 konversion lisäksi oma tästä riippumaton vaikutusreittinsä. (Pro)reniinireseptori (PRR = (pro)reninreceptor) toisaalta muuttaa inaktiivisen proentsyymi proreniinin konformaatiota ei-proteolyyttisellä mekanismilla siten, että reseptoriinsa sitoutuneesta molekyylistä tulee entsymaattisesti aktiivinen eli myös proreniinin on PRR:iin sitoutuneena mahdollista katalysoida angiotensinogeenin pilkkoutumista AT1:ksi.¹⁹

Toisaalta reniinin tai proreniinin sitoutuminen reseptoriinsa aktivoi solunsisäisen solunulkoisen signaalin säätelykinaasi 1/2:n (ERK 1/2 = extracellular signal-regulated kinase 1/2). ERK 1/2 säätelee edelleen useiden geenien aktivaatiota.^{19,20} Uuden tietämyksen valossa klassinen reniinin rooli ainoastaan angiotensinogeenin pilkkojana on kyseenalaistettu, mutta reniinin ja proreniinin suorien signaalintvaikutusten merkitys on epäselvä. PRR:ta on erityisesti sydämessä, aivoissa ja istukassa sekä vähäisemmissä määrin myös munuaisissa ja maksassa¹⁹.

ACE on kalvoproteiini, joka muuttaa biologisesti inaktiivisen AT1:n RAAS:n keskeisimmäksi aktiiviseksi molekyyliseksi AT2:ksi. AT2 vaikutukset välittyvät angiotensiini 2 tyypin 1 ja 2 reseptorien (AT2R1 = angiotensin II type1 receptor, AT2R2 = angiotensin II type 2 receptor) välityksellä. Verenpaineen säätelyn kannalta keskeisin on AT2R1. AT2:den sitoutuminen AT2R1:n vaskulaarisessa sileässä lihaskudoksessa aiheuttaa sileiden lihassolujen supistuksen ja siten vasokonstriktion. AT2:n sitoutuminen spesifisesti AT2R1:een aktivoi Janus kinaasi 2:n (JAK2 = Janus kinase 2), joka edelleen fosforyloi spesifisen guaniininukleotidivaihtotekijän Arhgef1. Arhgef1 laukaisee RhoA signaalin ja edelleen aktivoi Rho-kinaasin, joka inhiboi myosiinin kevytketjufosfataasia ja siten edistää vaskulaarisen sileän lihassolukon supistumista.²¹⁻²⁴ Spesifinen JAK2 inhibiittori AG490 estää AT2 välitteisen sileän lihassolukon supistumisen, mutta ei merkittävästi vaikuta vasokonstriktioon fenyylifriini-, U46619- tai endoteliini-1-välitteisesti²³. Toisaalta AT2 näyttäisi vaikuttavan sileiden lihassolujen supistumiseen myös epäsuorasti keskushermostovälitteisesti²⁵ ja toisaalta munuaisen rooli AT2 verenpainevaikutuksen välittäjänä on tunnettu²⁶.

Verenpaineen säätelyn lisäksi pääasiassa AT2R1 välitteisesti näyttävät välittyvän myös muut keskeisimmät tunnetut AT2 vaikutukset. AT2R1 aktivaatio vaikuttaisi olevan mukana useiden autoimmuunisairauksien patofysiologiassa ja tässä inflammaatioprosessit näyttäisivät olevan keskeisessä roolissa²⁴. AT2R1-salpaajien suotuisat vaikutukset sydän- ja verisuonisairauksiin ovat tulleet esiin useissa suurissa kliinisissä

lääketutkimuksissa. Suojaavat vaikutukset välittyvät verenpaineen laskun sekä arterioskleroottisten prosessien ja kohde-elinvaurioiden hidastumisen kautta ^{27,28}. Edelleen AT1R1 disruptio pidensi merkittävästi hiirien elinikää ja edelleen nämä vaikutukset yhdistettiin vähentyneeseen oksidatiiviseen stressiin ja mitokondriaaliseen suojavaikutukseen ^{24,29}. AT2R1 vaikuttaisi siis olevan mukana keskeisesti mukana myös ikääntymisprosessien biologiassa – ainakin hiirimallissa.

AT2:n AT2R2-välitteiset vaikutukset ovat AT2R1-välitteisiä vaikutuksia huonommin tunnettuja, mutta ovat olleet lisääntyvän kiinnostuksen kohteena. Normaalitilanteessa merkitys vaikuttaisi olevan varsin vähäinen, mutta AT2R2:den ilmentyminen ja myös suojavaikutukset näyttäisivät korostuvan patologisissa tilanteissa esimerkiksi sydäninfarktin, haiman fibrotisoitumisen tai aivoinfarktin yhteydessä ²⁴. AT2R2 aktivaatio on yhdistetty vasodilataatioon, verenpaineen laskuun ja kardiovaskulaariseen suojavaikutukseen. AT2R2 aktivaatio näyttäisi siis aiheuttavan osittain vastakkaisia vaikutuksia AT2R1:n nähden ja AT2R2 aktivaation on osoitettu olevan AT2R1 vaikutuksen suora antagonisti heterodimeerimuodostuksen kautta ³⁰. Nämä vaikutukset välittyvät ainakin osittain JAK/STAT ³¹ ja NF-κB ³² signaalivälitysketjujen inhibition ja typpioksidin vapautumisen kautta ³³.

AT3:n vaikutukset välittyvät AT2 tapaan AT2R1 ja AT2R2 kautta. AT4 vaikuttaa insuliinin säätelemien aminopeptidaasireseptorien (IRAP = insulin-regulated aminopeptidase receptors) kautta. IRAP aktivoi edelleen NF-κB signaalinvälitysketjun. AT4 näyttäisi säätelevän kognitiota, munuaisten aineenvaihduntaa ja sydän- ja verisuonivauriomekanismeja²⁰. AT 1-7 vaikutukset välittyvät Mas -reseptorin kautta ³⁴.

Glukoosin insuliinivälitteinen kuljetus luurankolihasoluun

Luurankolihas vastaa keskeisimmiltä osin elimistön insuliinivälitteisestä glukoosin soluun otosta. Terveessä elimistössä tehokkaalla glukoosin kuljetuksella plasmasta luurankolihasiin ylläpidetään optimaalista plasman

glukoosipitoisuutta hiilihydraattipitoisen aterian jälkeen. Luurankoliuksessa glukoosi edelleen varastoidaan glykokeeniksi tai siitä tuotetaan energiaa. Glukoositasapaino on eräs elimistön tarkimmin säädellyistä prosesseista. Halutessamme ymmärtää luurankolihasolun glukoosiaineenvaihduntaa pintaa syvemmältä tulee kiinnittää huomiota sekä aineenvaihduntaa tehostaviin ja heikentäviin solunulkoisiin tekijöihin ja niiden aktivoimiin ja inhiboimiin solunsisäisiin signaalinvälitysketjuihin ja toisaalta tunnettava hyvin glukoosin luurankolihasoluun siirtymiseen osallistuvien kuljettajaproteiinien toiminta ja säätelymekanismit.

Luurankoliuksessa keskeisin glukoosin kuljettajaproteiinien solukalvolle kertymistä, ja sitä kautta glukoosin kuljetusta, edistävä tekijä on haiman β -solujen tuottama insuliini-hormoni. Muita tärkeitä glukoosin soluun ottoa lisääviä tekijöitä ovat hapenpuute ja lihassupistus. Glukoosiaineenvaihduntaa heikentäviä tekijöitä tunnetaan useita, mutta näitä käsitellään tarkemmin insuliiniresistenssiä käsittelevässä kappaleessa. Tässä kappaleessa hahmotellaan aluksi glukoosin kuljettajaproteiinin toimintaa ja tämän jälkeen paneudutaan insuliinivaikutuksen luurankolihasolun sisäiseen signaalinvälitysketjuun ja tämän aikaansaamaan glukoosin kuljettajaproteiinien siirtymiseen solukalvolle. Insuliinivälitteistä glukoosin soluun siirtymistä aktivoivat ja inhiboivat tekijät sekä näiden vaikutusta välittävät signaalinvälitysketjut ovat kiihkeästä tutkimuksesta huolimatta monilta osin epäselviä.

Glukoosin kuljetus plasmasta kohdesolujen sisään tapahtuu pääasiassa transmembraanisten GLUT-kuljettajaproteiinien (GLUT = glucosetransporter) välityksellä. Proteiiniperheen jäseniä tunnetaan kolmesta erilaista GLUT1-12 ja HMIT^{35,36}. Proteiiniperheen jäsenet koostuvat kahdestatoista solukalvon läpäisevästä proteiinisegmentistä. Eri kudoksissa glukoosin kuljetusta säädelään hieman eri tavoin ja kanavaproteiinien rakenne poikkeaa jonkin verran toisistaan. Luurankolihasen tehokkaasta insuliinivälitteisestä glukoosin kuljetuksesta vastaa GLUT4 (proteiinin nimi: GLUT4, geenin nimi: SLC2A4)^{37,38}. GLUT4:n poikkeaa sekä N- että COOH-

terminaalisilta osiltaan muista glukoositransporttereista. Terminaaliset domeenit sijaitsevat sytoplasmisesti ja lienevät keskeisessä roolissa kuljettajaproteiinin solunsisäisen kuljetuksen säätelyssä ³⁹. Muita luurankolihasessa esiintyviä glukoosiaineenvaihduntaan osallistuvia kuljetusproteiineja ovat GLUT1, GLUT5 ja GLUT12 ^{40,41}, mutta näiden merkitys insuliinin stimuloimassa tilanteessa on vähäinen. GLUT4:n rakennetta, toimintaa ja säätelyä sekä merkitystä glukoosihomeostaasin kannalta käsitellään laajasti katsausartikkelissa ³⁹.

Luurankolihasessa GLUT4:t ovat solukalvolla (PM = plasma membrane) tai solunsisäisten erityisten varastovesikkelien (GSVs = GLUT4 storage vesicles) pinnalla. Glukoosin kuljetusta solukalvon läpi säädellään varastovesikkelien solunsisäisen kalvoliikenteen avulla. GSV:n yhtyessä PM:n kanssa kertyy GLUT4 kuljetusproteiineja solukalvolle ja glukoosin siirtyminen solukalvon läpi tehostuu. Lepotilassa GLUT4:n ilmeneminen solukalvolla on varsin vähäistä, mutta insuliinin aktivoimassa tilanteessa GLUT4:n määrä nopeasti moninkertaistuu. Tarkan säätelyn alaisena – ja siten myös häiriöille alttiina – ovat useat GSV:n kuljetusprosessin osat. GLUT4:n transkription, translaation, glykosylaation jälkeen kalvolle tuotetun proteiinin kuljetus perustuu solunsisäiseen membraaniliikenteeseen. Insuliini säätelee keskeisesti GLUT4:n solukalvolle kuljetusta eli eksosytoosia ja GLUT4:n kuljetusta pois plasmamembraanilta eli endosytoosia. Insuliinivaikutus eksosytoosiin on lisäävä ja endosytoosiin hillitsevä ^{38,39}.

GLUT4-geenin ilmentymiseen ja sen myötä GLUT4-proteiinin ja mRNA:n tuotantoon ja toisaalta hajottamiseen vaikuttavista spesifisistä tekijöistä tiedetään varsin vähän. Lihavuuden ⁴² ja edelleen DM2:n tiedetään vaimentavan GLUT4-geenin ilmentymistä rasvakudoksessa. Saman suuntainen vaikutus tiedetään olevan immobilisaatiolla ⁴³ ja paastolla ⁴⁴ rotan takaraajan gastrocnemius- ja soleus-lihaksissa. Toisaalta GLUT4-geenin ilmentymisen tiedetään lisääntyvän harjoituksen vaikutuksesta ⁴⁵.

Tarkastellaan seuraavaksi insuliinivaikutuksen välittymistä solun sisällä hieman tarkemmin. Insuliinin kiinnittyminen reseptoriinsa (IR = insulinreceptor) johtaa reseptorin autofosforylaatioon ja edelleen tyrosiinikinaasiaktivaatioon, josta seuraa IRS:ien (IRS = insulinreseptorsubstrate) tyrosiinifosforylaatio ja edelleen fosfoinositoli-3-kinaasin (PI3K = phosphatidylinositol 3-kinase) aktivaatio. GSV:n aktivoituminen insuliinin vaikutuksesta vaatii PI3K:n välittäjäkseen. Toisaalta IR voidaan defosforyloidaproteiini-tyrosiini-fosfataasien (PTPs) välityksellä.

Alavirrassa PI3K:sta keskeinen entsyymi on proteiinikinaasi Akt2 (Akt2 = RAC-beta-serine/threonine-proteinkinase) ^{39,46}. PI3K:n Akt2:ta aktivoiva vaikutus välittyy sekä solukalvon fosfolipidien fosforylaation että PIP2:n (PIP2 = phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) fosforylaation (positiosta 3) välityksellä aktivoiden PDK-1:n ja PDK-2:n (PKD = 3-phosphatidylinositol-dependent proteinkinases) ⁴⁷. Vaikutusta välittämässä on myös Rictor/mTOR –kompleksi ⁴⁸. Lisäksi PKC λ ja PKC ξ (PKC λ/ξ = atypical proteinkinase C λ/ξ) ⁴⁹ aktivoituvat, mutta niiden rooli signaalinvälitysketjussa on epäselvä.

Lisäksi esimerkiksi lipidi-fosfataasi PTEN:n (PTEN = phosphatase and tension homologuedeleleted on chromosome 10) tiedetään olevan tärkeä insuliinivaikutuksen negatiivinen säätelijä. PTEN:n vaikutus välittyy PIP3:n (PIP3 = phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) hydrolysaation PIP2:ksi kautta ⁵⁰. Lihasspesifinen PTEN-deleetio suojaa runsaasti rasvaa sisältävää ravintoa (HFD = high-fat diet) syöviä hiiriä insuliiniresistenssin ja diabeteksen kehittymiseltä ⁵¹. Suojavaikutuksen takana HFD-hiirillä on ilmeisesti ainakin osittain PTEN-inhibition aikaansaama lihassoluregeneraatio ⁵². Insuliinivaikutuksen fysiologinen säätely on tasapainoilua fosforylaatio- ja defosforylaatiotapahtumien välillä.

160 kDa painoinen Akt2 substraatti AS160 (AS160 = a 160-kDa substrate of Akt), joka tunnetaan myös nimellä TBC1D4 (TBC1D4 = Tre-2 BUB2 CDC16, 1 domainfamilymember 4), on keskeinen linkki Akt2:n ja GSV:n välillä ⁵³. AS160 tiedetään sisältävän guanosiinitrifosfataasia (GTPase) aktivoivan domeenin

(GAP). GAP:n keskeinen tehtävä insuliinivaikutuksessa on myötävaikuttaa GTP:n sitoutumiseen pieniin solunsisäistä vesikkeliliikennettä sääteleviin G-proteiineihin, joita kutsutaan nimellä Rab. Lepotilassa Rab:t ovat inaktiivisessa guanosinidifosfaattiin (GDP) sitoutuneessa tilassa. Insuliinin sitoutuessa reseptoriinsa ja IR/IRS1/PI3K/Akt2 -signaalivälitysketjun aktivoiduttua Rab:t muuttuvat aktiiviseen GTP:hen sitoutuneeseen tilaan lisäten GSV:n eksosytoosia. Rab-proteiineja on useita ja lukuisat näistä osallistuvat glukoosin kuljetukseen ⁴⁶. AS160:n lisäksi tunnetaan toinen Rab-GAP TBC1D1, jonka Rab spesifisyys on identtinen TBC1D4:n nähden. TBC1D1 esiintyy erityisesti luurankolihasissa ja kiinnostavaa kyllä sen geneettinen variaatio R125W on liitetty ihmisillä obesiteettiin ^{46,54}. Lisätutkimukset ovat tarpeen toisaalta selvittämään eri Rab:ien ja toisaalta TBC1D1:n merkitystä GLUT4:n säätelyssä.

GLUT4 varastovesikkelien liikenteeseen solukalvolle vaikuttaa solunsisäinen kuljetusjärjestelmä mikrotubulus- ja mikrofilamenttisäieverkostoineen sekä edelleen mekanismit jotka vaikuttavat varastovesikkelien tarrautumiseen, telakoitumiseen ja fuusioitumiseen solukalvon kanssa ⁵⁵. Mikrotubulukset ottavat osaa varsinkin pitkäaikaiseen GSV liikenteeseen perustilassa ja mikrofilamenttisäikeet näyttävät osallistuvan erityisesti insuliinivaikutuksen välittämiseen. Insuliini aktivoi PI3K-välitteisesti GSV liikenteeseen assosioitunutta Ral guanosinitrifosfataasia (RalA) ja PI3K:sta riippumattomasti Rho guanosinitrifosfataasi TC10:tä (RhoGTPase TC10). TC10 osallistuu GSV:n kiinnittämiseen ja aktiinirakenteen uudelleen organisoimiseen solukalvolla mahdollistaen fuusiotapahtumaa. Myös lukuisia muita proteiineja assosioituu solunsisäiseen GSV liikenteeseen ja GLUT4:n translokaatioon PM:lle ⁴⁶.

Uusien tutkimusten valossa insuliini näyttäisi myös vaikuttavan solukalvon rasva-ainekoostumukseen edistämällä GSV:n ja PM:n fuusiota. Ottaen huomioon rasva-aineiden keskeisen merkityksen glukoosiainenvaihdunnan häiriöiden patogeenisissä, ovat tutkimustulokset insuliinin suorista solukalvon rasva-ainekoostumukseen kohdistuvista säätelyvaikutuksista kiinnostavia. Insuliini

säätää myös Akt2:sta riippumattomasti, mutta PI3K-välitteisesti, GSV:n ja PM:n fuusiota. Tässä keskeiseksi saattavat osoittautua PI3K/PKC λ /ξ ja PI3K/PDK1 –signaalinvälitysketjut. Fuusiossa tarvittavan kaveolimudostuksen reuna-alueet ovat elektronimikroskopia tutkimuksin osoittautuneet PIP2 tiheiksi ⁴⁶.

Insuliiniresistenssi luurankolihasessa

Glukoosihomeostaasin kannalta keskeistä on nopea insuliinivaikutus, jonka tehtävä on stimuloida glukoosin kuljetusta perifeerisiin kohdekudoksiin. Luurankolihas on ensisijainen kohde insuliinivälitteiselle glukoosin soluunotolle ja insuliinivaikutuksen häiriöt luurankolihasessa ovat keskeisessä roolissa T2D:n patogeneesissä. T2D:tä sairastavilla henkilöillä GLUT4-geenin ilmentyminen ja solunsisäinen GLUT4-pitoisuus on normaalia ⁵⁶ ja ajatellaankin, että keskeiset häiriöt insuliinivaikutuksessa ovat GSV:n kuljetuksessa, tarrautumisessa, telakoitumisessa ja fuusioitumisessa solukalvolle sekä GLUT4:n mahdollisissa toimintahäiriöissä ^{46,55,57,58}.

Toisaalta insuliiniresistenssimekanismit ovat luurankolihasessa hyvin monitekijäisiä ja esimerkiksi ROS:in (ROS = reactive oxygen species), jonka ajateltiin pitkään olevan synnyttämässä insuliiniresistenssiä ⁵⁹, on havaittu toisaalta myös edistävän insuliinivälitteistä glukoosiaineenvaihduntaa inhiboimalla PTEN:n toimintaa oksidaation kautta ⁶⁰.

T2D:tä sairastavilla henkilöiden luurankolihasen insuliinin stimuloiman PI3K-aktiivisuuden on havaittu olevan alentunutta terveisiin koehenkilöihin verrattuna ^{61,62} viitaten häiriöön insuliinisignaloinnissa. Toisaalta ylipainoisten T2D:tä sairastavien tai sitä sairastamattomien koehenkilöiden insuliinin stimuloima Akt-aktiivisuus on normaali *in vivo* ⁶² ja ero Akt-aktiivisuudessa tulee esiin vain suurilla insuliinikonsentraatiolla *in vitro* ⁶³. Toisaalta Akt2 fosforylaation on havaittu olevan puutteellista ylipainoisten T2D:tä sairastavien rasvakudoksessa ⁶⁴. Koe-eläintyöt viittaisivat siihen, että täyttä PI3K-aktivaatiota ei tarvittaisi maksimaaliseen Akt-aktivaatioon ja

myös siihen, että osa insuliinin stimuloimasta Akt-aktivaatiosta tulisi PI3K:sta riippumattomasti ⁶⁵. On kuitenkin muistettava, että PI3K osallistuu myös Akt2:den suhteen alavirrassa insuliinivaikutuksen signalointiin.

PI3K:sta ylävirtaan IRS1:n insuliinivaikutuksen kannalta merkittäviin seriinin fosorylaatiotapahtumiin näyttäisi vaikuttavan Rho-kinaasi ROCK1 (ROCK = GTP-Rho-bindingprotein / serine/threonine proteinkinase), jolla saattaa olla merkitystä insuliiniresistenssin patogeneesissä ^{54,66}.

RAAS ja insuliiniresistenssi

Sydän- ja verisuonisairastavuuden vähenemisen lisäksi useissa laajoissa kliinisissä lääketutkimuksissa on tullut esiin ACE-estäjien ja AT2R1-salpaajien insuliiniherkkyyttä parantava ja uusia diabetestapauksia vähentävä vaikutus. Vaikutus on havaittu esimerkiksi VALUE ⁶⁷, NAVIGATOR ⁶⁸, ALLHAT ⁶⁹, HOPE ⁷⁰, CAPPP ⁷¹, CHARM ⁷², SOLVD ⁷³ ja LIFE ⁷⁴ – tutkimuksissa ja aiemmista hypoteeseista poiketen vaikutus näyttäisi välittyvän suurelta osin lääkeaineiden aiheuttamasta verenpaineen laskusta riippumattomasti. AT2:den ja insuliinin aineenvaihdunta on monilta osin toisiinsa kietoutunutta. RAAS järjestelmällä on keskeinen rooli verenpaineen säätelyn lisäksi myös insuliinin klassisissa kohdekudoksissa ja toisaalta insuliinilla vaikuttaa olevan merkittäviä säätelyvaikutuksia sydän- ja verenkiertoelimistössä ^{75,76}.

Patologinen RAAS-aktivaatio vaikuttaisi olevan keskeisessä roolissa endoteelidysfunktion ja insuliiniresistenssin kehityksessä useissa elimissä ⁷⁷⁻⁸⁰ ja useat RAAS:in molekyyleistä lienevät mukana patofysiologiassa. Useissa tutkimuksissa plasman kohonneen aldosteronitason on näytetty korreloivan insuliiniresistenssin kanssa ja aldosteronitason nousu saattaa edeltää insuliiniresistenssiä ^{76,81,82}. Primaarisen hyperaldosteronismin hoitaminen kirurgisesti tai mineralokortikoidireseptoriantagonisteilla näyttäisi parantavan insuliiniherkkyyttä ⁸³. Toisaalta AT2-AT2R1 signalointireitillä näyttäisi olevan interaktioita aldosteroni-mineralokortikoidi-reseptorisignaloinnin kanssa ⁸⁴. Liiallinen aldosteronipitoisuus lisää ROS-

tuotantoa solukalvon NADPH-oksidaasin (NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) aktivaation kautta, mikä edelleen johtaa insuliini signaloinnin inhibitioon IRS-1 ja IRS-2 tasolla 3T3-L1-rasvasoluissa ⁸⁵ ja hiiri- ja rottamalleissa Lagerhansin saarekkeissa ⁸⁶.

Reniinillä näyttäisi olevan osittain itsenäinen roolinsa myös RAAS:in välittämien insuliiniresistenssimekanismien synnyssä. Pitkäaikaissurannoissa on havaittu plasman reniinitason reaktiivisesti nousevan ACE-estäjiä tai AT2R1-salpaajia käytettäessä ja on luontevaa ajatella PRR kautta välittyvien signalointivaikutusten korostuvan. Reniini inhibitiolla suoran reniini inhibiittorin aliskireenin avulla on havaittu suotuisia vaikutuksia verenpaineeseen, sydänlihaksen hypertrofiaan ja diabeettiseen nefropatiaan ⁸⁷⁻⁹¹. Lisäksi koe-eläintöissä on havaittu aliskireenin parantavan insuliiniherkkyyttä, vähentävän oksidatiivista stressiä, parantavan haiman uudistumiskykyä ja lisäävän luurankolihasessa glukoosin kuljetusta solukalvon yli ^{76,92,93} viitaten siihen, että reniinillä voisi olla rooli insuliiniresistenssin patofysiologiassa.

AT2 näyttäisi olevan myös insuliiniresistenssin kannalta RAAS keskeisin molekyyli ja tätä tukee ACE-estäjillä ja AT2R1-salpaajilla kerätty laaja kliininen tutkimusnäyttö. Mekanismi AT2:n aiheuttaman insuliiniresistenssin taustalla näyttäisi olevan luurankolihasessa imflammaatioprosesseissa keskeinen NF- κ B -signalointijärjestelmä. Koe-eläintöiden perusteella vaikuttaisi siltä, että patologisella tasolla olevan AT2-tuotannon aiheuttama ROS-tuotanto aktivoi lihasolussa NF- κ B -signalointireitin NADPH oksidaasin välittämänä ^{79,80}.

Aineisto

Tutkimusaineisto koostuu vapaaehtoisten koehenkilöiden veri- ja lihasnäytteistä mitatuista ja terveystarkastuksen yhteydessä määritetyistä suureista. Aineisto käsillä olevaan tutkimukseen kerättiin syksyllä 2009 ja keväällä 2010. Koehenkilöt rekrytoitiin Helsingin Sanomissa julkaistulla lehti-ilmoituksella. Koehenkilöt eivät saaneet tutkimukseen osallistumisestaan korvausta. Koehenkilöiksi haettiin tupakoimattomia 18-65-vuotiaita miehiä, joilla ei ollut todettuja pitkäaikaissairauksia eikä säännöllistä lääkitystä. Koehenkilöt eivät käyttäneet tutkimuksen aikana myöskään luontaislääkkeitä, omega 3- rasvahappovalmisteita tai muita vastaavia valmisteita. Koehenkilöiksi hakeutuneista henkilöistä yhtä ei voitu ottaa mukaan todetun pitkäaikaissairauden vuoksi ja lisäksi yksi koehenkilö hylättiin toisella tutkimuskäynnillä omega-3 rasvahappovalmisteen käytön vuoksi. Lopullisessa analyysissä on otettu huomioon kaikkien molemmille tutkimuskäynneille osallistuneiden 14 henkilön mittaustulokset.

Taulukko 1: Yhteenveto koehenkilöiden (N=14) kehon koostumuksesta, verenpaineesta ja verinäytteistä analysoiduista suureista. * keskiarvo molemmilta tutkimuskäynneiltä.

Suure	Minimi	Maksimi	Keskiarvo	Keskihajonta
Ikä (vuotta)	46.58	65.89	57.83	6.22
Paino (kg)	58.00	115.00	81.86	12.73
Pituus (cm)	174.00	187.00	178.81	4.13
BMI (kg/m ²)	19.00	34.60	25.55	3.53
Vyötärön ympärys (cm)	70.00	123.00	95.14	11.66
Lantion ympärys (cm)	87.00	118.00	99.36	6.89
Vyötärö-lantio -suhde	0.80	1.07	0.95	0.06
Systolinen verenpaine (mmHg)	121.00	170.00	143.86	14.88
Diastolinen verenpaine (mmHg)	69.00	110.00	89.29	10.30
Pulssi (1/min)	48.00	89.00	67.69	12.69
B-HbA1c (%)	4.70	6.40	5.49	0.42
fP-Kol (mmol/l)	4.20	7.40	5.66	0.91
fP-Trigly (mmol/l)	0.50	2.70	1.32	0.74
fP-Kol-HDL (mmol/l)	0.90	2.10	1.34	0.37
fP-Kol-LDL (mmol/l)	1.80	5.60	3.72	0.97

fP-Gluk (mmol/l) *	4.95	6.80	5.65	0.48
P-Gluk-R2h (mmol/l)	3.50	7.80	5.40	1.21
Paaston pituus (h)	12.00	17.00	13.61	1.75

Koehenkilöt kävivät kaksi kertaa varsinaisella tutkimuskäynnillä ja yhden kerran jälkitarkastuksessa. Tutkimuskäynnit ja jälkitarkastus toteutettiin Biomedicum 2U -rakennuksessa Kliinisen tutkimuksen tiloissa. Ohjeet tutkimusta ja tutkimuskäyntejä varten potilaat saivat puhelimitse ja sähköpostitse ennen ensimmäistä tutkimuskäyntiä sekä muistutuksena ennen toista tutkimuskäyntiä. Tutkimuskäynneille koehenkilöt saapuivat aamulla kello 7-10 välisenä aikana vähintään 12 tunnin paaston jälkeen. Liikunta oli kiellettyä kolme vuorokautta ja alkoholin nauttiminen yksi vuorokausi ennen molempia tutkimuskäyntejä. Ensimmäisellä tutkimuskäynnillä koehenkilöille tehtiin terveystarkastus ja kahden tunnin glukoosirasitus. Terveystarkastuksessa kartoitettiin koehenkilöiden yleistä terveydentilaa ja sukurasitetta diabeteksen suhteen sekä mitattiin potilaiden paino, pituus, verenpaine, pulssi sekä vyötärön ja lantion ympärys. Verenpaine mitattiin kertamittauksena digitaalisella verenpainemittarilla istuma-asennossa.

Verinäytteitä otettiin molempien tutkimuskäyntien yhteydessä ja niistä analysoitiin plasman glukoosi, triglyseridi, kokonaiskolesteroli, LDL ja HDL-pitoisuudet sekä veren HbA1c-pitoisuus (HUSLAB). Taulukossa 1 esitetty plasman glukoosipitoisuuden paastoarvo fP-Gluk on tutkimuskäyntien keskiarvo, P-Gluk-R2h on ensimmäisellä tutkimuskäynnillä mitattu glukoosirasituskokeen kahden tunnin arvo ja muut verinäytteestä mitatut arvot ovat paastoarvoja toiselta tutkimuskäynniltä. Toisella tutkimuskäynnillä kultakin koehenkilöiltä otettiin yhteensä noin kolmen gramman lihasnäyte käyttäen myöhemmin tarkemmin kuvattavaa avolihasbiopsiatekniikkaa. Lihasnäytettä tutkittiin välittömästi edelleen *ex vivo* -inkubaatioin.

Ex vivo –inkubaatioissa koehenkilöiden lihasnäytteestä erotettuja pienempiä noin 25 milligramman painoisia lihassuikaleita inkuboitiin edelleen kiinnostuksen kohteena olevia molekyylejä sisältävissä puskureissa. Lihasnäytteistä määritettiin inkubaatioiden jälkeen glukoosin soluun kuljetusta radioaktiivisten merkkiaineiden avulla. Yksittäisen koehenkilön lihasnäyte jaettiin siten, että kutakin erilaista olosuhdetta kohden oli 1-3 erillistä näytettä, joiden keskiarvoja on käytetty edelleen analyysien pohjana. Joitakin yksittäisiä mittaustuloksia ei ole otettu epäluotettavina huomioon. Näin on toimittu tapauksissa, joissa on ollut syytä lihassuikaleen kuntoa mittaavien parametrien (liian suuri ekstrasellulaaritila) perusteella olettaa lihasnäytteen käsittelyssä vahingoittuneen.

Menetelmät

Lihasnäytteiden analysoinnissa käytetty menetelmä on parhaiten kuvattu liitteissä ⁹⁴⁻⁹⁶.

Kahden tunnin glukoosirasitus

Kahden tunnin glukoosirasitus toteutettiin siten, että tutkimusaamuna koehenkilöltä otettiin laskimoverinäyte vähintään 12 tunnin paaston jälkeen (2 ml laskimoverinäyte fluoridisitraattiputkeen). Tämän jälkeen koehenkilö nautti nopeasti (5 min sisällä) glukoosiliuoksen, joka sisälsi 75 grammaa glukoosia 300 millilitrassa vettä. Laskimoverinäyte otettiin uudestaan 120 minuutin kuluttua glukoosin nauttimisesta. Plasman glukoosipitoisuudet fP-Gluk ja P-Gluk-R2h määritettiin edelleen heksokinaasimenetelmällä (HUSLAB - Meilahden sairaala).

Avolihasbiopsia

Lihasnäytteet tutkimusta varten otettiin käyttäen kirurgista avolihasbiopsiatekniikkaa. Lihasnäyte otettiin lidokaiini-paikallispuudutuksessa (10 mg/ml) vastus lateralis -lihaksesta noin neljän senttimetrin ihoviillon kautta. Ihoviillon jälkeen edettiin edelleen ihonalaisen rasvakerroksen lävitse lihaskalvon pintaan, joka edelleen puudutettiin ja puhkaistiin. Lihaksesta otettiin varoen yhteensä noin 3 g lihasnäyte 4-6 lihassäikeenä. Näytepalat siirrettiin välittömästi esikaasutettuun (95% O₂ ja 5% CO₂) huoneenlämpöiseen Krebs-Henseleit puskuriin (KHB = Krebs-Henseleit buffer). KBH sisälsi 5 mM HEPES, 5 mM glukoosia, 15 mM mannitolia ja 0.1% albumiinia naudan seerumista (BSA = bovine serum albumin) (RIA Grade; Sigma, St. Louis, MO, USA).

Inkubaatio

Varsinaista inkubaatiota edeltävästi lihasnäytteet preparoitiin edelleen pienemmiksi noin 10-25 milligramman kokoisiksi suikaleiksi. Yhdeltä koehenkilöltä näitä suikaleita saatiin 10-18 kappaletta. Lihasnäytteet asetettiin edelleen Plexiglass-pidikkeisiin ja pidikkeet siirrettiin edelleen astioihin, joissa oli 35°C lämpöistä esikaasutettua mainitunkaltaista KHB:ta. Inkubaatio toteutettiin edestakaisin liikkuvassa inkubaattorissa, jossa kaasufaasiin johdettiin jatkuvasti tuoretta kaasuseosta (95% O₂ ja 5% CO₂). 15 minuutin palauttavan periodin jälkeen inkubaatiota jatkettiin neljässä eri olosuhteessa: puskuriliuos, AT2 (100 nM) (Sigma, St. Louis, MO, USA), insuliini (1.2 nM) (Actrapid, Novo Nordisk, Denmark) sekä insuliini (1.2 nM) ja AT2 (100 nM). Kolmivaiheisen varsinaisen inkubaation ensimmäinen vaihe eli preinkubaatio kesti 30 minuuttia ja liuos oli jo mainitun kaltaista sisältäen 5 mM glukoosia ja 15 mM mannitolia. Toisessa vaiheessa liuos sisälsi 20 mM mannitolia eikä lainkaan glukoosia. 10 minuuttia kestävä vaiheen tarkoituksena oli glukoosin huuhtominen pois ekstrasellulaaritalasta seuraavaa vaihetta varten. Kolmannessa 20 minuuttia kestävässä transporttivaiheessa käytettiin radioaktiivisesti leimattuja 5 mM 3-O-metyyli[³H]glukoosia (800 µCi/mmol) ja 15 mM [¹⁴C]mannitolia (53 µCi/mmol) (GE Healthcare, Life Sciences, Whitchurch, Cardiff, UK). Yhteensä lihasnäytteitä altistettiin 60 minuutin ajan tutkittavalle olosuhteelle. Näytteet jäädytettiin välittömästi transporttivaiheen jälkeen nestemäisessä tyypessä ja varastoitettiin -80°C lämpötilaan jatkokäsittelyä varten.

Näytteiden käsittely

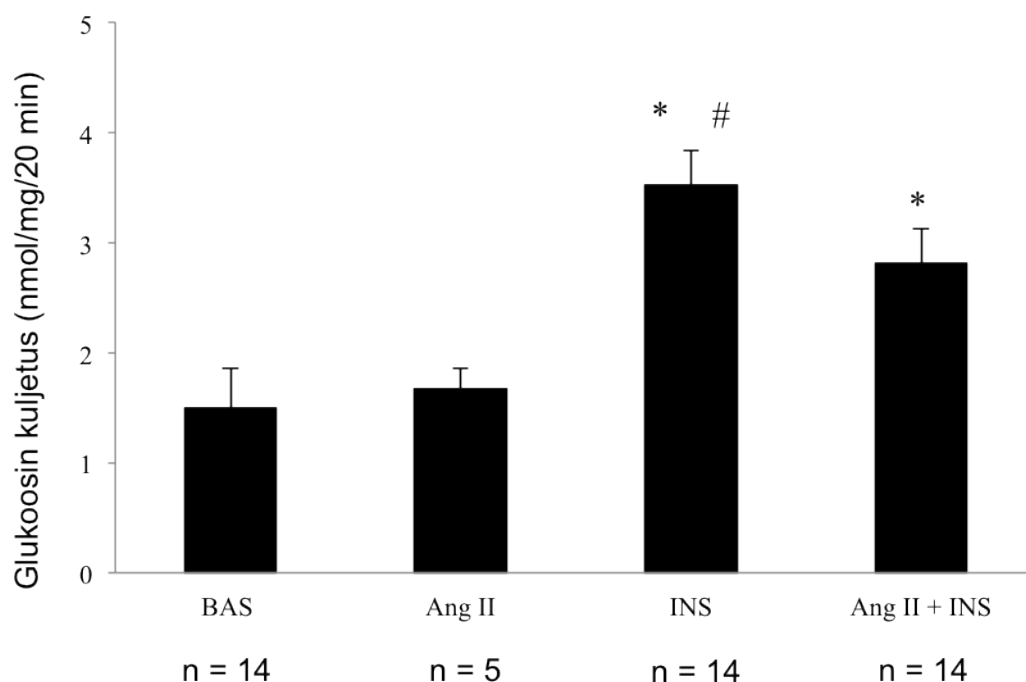
Lihasnäytteet homogenisoitiin mekaanisesti hiertämällä 4°C lämpöisessä homogenisaatiopuskurissa (90 µl/µg lihasnäytettä). Homogenisaatiopuskuri sisälsi 20 mM Tris (pH 7.8), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 10% (w/v) glyserolia, 10 mM NaF, 0.5 mM Na₃VO₄, 1 µg/mL leupeptiini, 0.2 mM fenyylimetyylisulfonylfluoridia, 1 µg/mL Laprotiniinia ja

1 μM mikrokystiniä. Edelleen näytteitä sekoitettiin 4°C lämpötilassa 60 minuutin ajan, jonka jälkeen näytteitä sentrifugoitiin 10 min 4°C lämpötilassa 12000 g:n kiihtyvyydellä. Supernatantin proteiinikonsentraatio mitattiin käyttämällä BCA proteiinikoetinta (Pierce, Rockford, IL, USA). Homogenaatti sekoitettiin β -merkapttoetanolia sisältävään Laemmli puskuriin, jota lämmitettiin 56°C 20 minuutin ajan.

Glukoosin soluun kuljetuksen määrittäminen

Osa edellä mainitulla tavalla käsitelystä lihasnäytteestä käytettiin glukoosin soluun kuljetuksen määrittämiseen. Radioaktiivisten 3-*O*-metyyli[^3H]glukoosi ja [^{14}C]mannitoli isotooppien avulla määritettiin 20 minuutin aikana soluun kuljetetun glukoosin määrä. Mannitoli-isotooppia käytettiin solunulkoisen tilan määrittämiseen. Aktiivisuudet määritettiin β -laskurin avulla.

Tulokset



Oheisessa kuvaajassa on esitetty AT₂ vaikutus glukoosin kuljetukseen kuvatunkaltaisessa koejärjestelyssä. Kuvaajassa on koottu yhteen lihasnäytteistä mitattu glukoosin kuljetus yksikössä nmol/mg/20min yhteensä 14 koehenkilöltä. Kunkin koehenkilön näytteistä on kussakin olosuhteessa laskettu keskiarvo ja näiden pohjalta on edelleen laskettu keskiarvot, jotka on esitetty kuvaajassa. * on merkitty insuliinin sekä insuliinin ja AT₂:n tilastollisesti merkittävää (p-arvo < 0.05) eroa pelkkään puskuriliuokseen verrattuna. Insuliini lisäsi koeasetelmassa glukoosin kuljetusta 2.4-kertaiseksi ja insuliini ja AT₂ yhdessä vastaavasti 1.9-kertaiseksi. # on merkitty AT₂ ja insuliinin tilastollisesti merkittävää (p-arvo < 0.05) eroa pelkkään insuliiniin nähden. AT₂ vähensi glukoosin kuljetusta 20 % insuliinin läsnä ollessa. Insuliinin puuttuessa AT₂:lla ei ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta glukoosin kuljetukseen. Kuvaajassa kapeilla janoilla on merkitty keskiarvon keskivirhettä ja tilastollisena menetelmänä käytettiin Studentin t-testiä.

Pohdintaa

Tutkimustuloksemme tukevat nykykäsitystä ACE-estäjien ja AT2R1-salpaajien diabeteksen syntyä ehkäisevästä vaikutuksesta verenpaineen laskusta riippumattomalla mekanismilla. AT2 aikaansaa nopean insuliiniherkkyyden heikentymisen terveiden koehenkilöiden luurankolihasessa. AT2:den aiheuttaman insuliiniresistenssin syntyä ei ole aiemmin tutkittu intakteissa ihmislihasnäytteissä ja käyttämämme tutkimusmenetelmä on ryhmämme lisäksi ihmislihasnäytteiden osalta käytössä ainoastaan Kanadassa Guelphin yliopistossa professori David Dyckin ryhmässä ja Ruotsissa Karoliinisessa instituutissa professori Juleen Zierathin ryhmässä. Menetelmä mahdollistaa glukoosin kuljetuksen tutkimisen suoraan intakteissa lihasnäytteissä ex vivo.

Tutkimuksemme mukaan AT2:lla vaikuttaisi olevan nopeasti ilmenevä glukoosin kuljetusta vähentävä vaikutus ihmisen luurankolihasolussa. Tämä vaikutus tulee esiin ex vivo –lihasnäytteissä yhteensä tunnin mittaisen inkubaatioajan puitteissa. Vaikutus tuli esiin ainoastaan insuliinin stimuloimassa tilanteessa. AT2:den aiheuttama glukoosin kuljetuksen vähenemisen ilmeneminen ainoastaan insuliinin stimuloimassa tilanteessa viittaisi AT2:den vaikuttavan glukoosiaineenvaihduntaan nimenomaan GLUT4-välitteisesti.

Havaitsimme AT1R1-salpaaja losartaanilla olevan tendenssin kumota vähentävä vaikutus (data not shown). Pienestä havaintojen lukumäärästä (n=5) johtuen tulos ei ollut tilastollisesti merkittävä. AT2:n akuutti glukoosin kuljetusta vähentävä vaikutus välittyneekin suurelta osin AT1R1-välitteisesti, mutta lisätutkimusta tarvitaan jotta vaikutusta välittävien signaalinvälitysketjujen toiminta ihmisen luurankolihasessa tulisi selvitettyksi. Signaaloinnin kannalta keskeisiä tutkimuskohteita ovat NF- κ B – signaalintijärjestelmä ja klassinen insuliinivaikutusta välittävä Akt signaalintireitti. Inkuboituja lihasnäytteitä on tutkittu edelleen tarkoituksena selvittää tutkittavien molekyylien aikaan saamien muutosten solun sisäisiä

signaalinvälitysketjuja, mutta näitä tuloksia ei esitetä tämän tutkimusprojektin yhteydessä.

RAAS-järjestelmän epäedullisen voimakas aktiivisuus näyttää olevan mukana MBO:n ja T2D:n kannalta keskeisissä patologisissa prosesseissa. Keskeisin järjestelmän molekyyleistä näyttäisi myös insuliiniresistenssin kehittymisen kannalta olevan AT2. Insuliiniresistenssin kehittyminen on T2D:n keskeisin riskitekijä. AT2 vähentää nopeasti glukoosin kuljetusta terveiden koehenkilöiden luurankolihasessa ja toisaalta AT2R1-salpaajilla ja ACE-estäjillä on T2D:sta ehkäisevä vaikutus. On mahdollisesta, että näillä ilmiöillä on yhteinen solubiologinen tausta. Jatkotutkimuksia tarvitaan AT2:den ja muiden RAAS-järjestelmän aktiivisten molekyyliden akuuteista ja kroonisista signalointivaikutuksista glukoosiaineenvaihduntaan ihmisen luurankolihasessa ja muissa insuliinin kohdekudoksissa.

Lähdeluettelo

1. World Health Organization. Office of Health Communications and Public Relations. Obesity and overweight. *Geneva: World Health Organization*. 3 p. p. 2006.
2. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas, 5th edn. *Brussels, Belgium: International Diabetes Federation*. 2011.
3. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35 Suppl 1:S64-71. doi: 10.2337/dc12-s064.
4. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, et al. The burden of mortality attributable to diabetes: Realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care*. 2005;28(9):2130-2135.
5. Peltonen M, Korpi-Hyövälti E, Oksa H, et al. Lihavuuden, diabeteksen ja muiden glukoosiaineenvaihdunnan häiriöiden esiintyvyys suomalaisessa aikuisväestössä. dehkön 2D-hanke. *Suomen Lääkärilehti*. 2006(3):163-8.
6. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-846. doi: 10.1038/nature05482.
7. Bouchard C. Gene-environment interactions in the etiology of obesity: Defining the fundamentals. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16 Suppl 3:S5-S10. doi: 10.1038/oby.2008.528.
8. Haus JM, Kashyap SR, Kasumov T, et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes*. 2009;58(2):337-343. doi: 10.2337/db08-1228.
9. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: Common threads and missing links. *Cell*. 2012;148(5):852-871. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.017.
10. Varma V, Yao-Borengasser A, Rasouli N, et al. Muscle inflammatory response and insulin resistance: Synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(6):E1300-10. doi: 10.1152/ajpendo.90885.2008.
11. Zeyda M, Stulnig TM. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. *Gerontology*. 2009;55(4):379-386. doi: 10.1159/000212758.
12. Glass CK, Olefsky JM. Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012;15(5):635-645. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.001.
13. Newsholme P, Gaudel C, Krause M. Mitochondria and diabetes. an intriguing pathogenetic role. *Adv Exp Med Biol*. 2012;942:235-247. doi: 10.1007/978-94-007-2869-1_10.
14. Chavez AO, Kamath S, Jani R, et al. Effect of short-term free fatty acids elevation on mitochondrial function in skeletal muscle of healthy individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(1):422-429. doi: 10.1210/jc.2009-1387.
15. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res*. 2008;102(4):401-414. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.165472.
16. Ahima RS. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nat Med*. 2009;15(9):996-997. doi: 10.1038/nm0909-996.

17. Karakelides H, Irving BA, Short KR, O'Brien P, Nair KS. Age, obesity, and sex effects on insulin sensitivity and skeletal muscle mitochondrial function. *Diabetes*. 2010;59(1):89-97. doi: 10.2337/db09-0591.
18. Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, et al. Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(4):895-900.
19. Nguyen G, Muller DN. The biology of the (pro)renin receptor. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(1):18-23. doi: 10.1681/ASN.2009030300; 10.1681/ASN.2009030300.
20. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008;264(3):224-236. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x; 10.1111/j.1365-2796.2008.01981.x.
21. Seko T, Ito M, Kureishi Y, et al. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res*. 2003;92(4):411-418. doi: 10.1161/01.RES.0000059987.90200.44.
22. Jin L, Ying Z, Hilgers RH, et al. Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(1):288-295. doi: 10.1124/jpet.105.100735.
23. Guilluy C, Bregeon J, Toumaniantz G, et al. The rho exchange factor Arhgef1 mediates the effects of angiotensin II on vascular tone and blood pressure. *Nat Med*. 2010;16(2):183-190. doi: 10.1038/nm.2079; 10.1038/nm.2079.
24. Stegbauer J, Coffman TM. New insights into angiotensin receptor actions: From blood pressure to aging. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(1):84-88. doi: 10.1097/MNH.0b013e3283414d40; 10.1097/MNH.0b013e3283414d40.
25. Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, Sigmund CD. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest*. 2000;106(1):103-106. doi: 10.1172/JCI10022.
26. Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(47):17985-17990. doi: 10.1073/pnas.0605545103.
27. Hirohata A, Yamamoto K, Miyoshi T, et al. Impact of olmesartan on progression of coronary atherosclerosis a serial volumetric intravascular ultrasound analysis from the OLIVUS (impact of OLmesarten on progression of coronary atherosclerosis: Evaluation by intravascular ultrasound) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55(10):976-982. doi: 10.1016/j.jacc.2009.09.062; 10.1016/j.jacc.2009.09.062.
28. Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, et al. Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in patients with heart failure (HEAAL study): A randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2009;374(9704):1840-1848. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61913-9; 10.1016/S0140-6736(09)61913-9.
29. Benigni A, Corna D, Zoja C, et al. Disruption of the ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(3):524-530. doi: 10.1172/JCI36703; 10.1172/JCI36703.

30. Miura S, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K. Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT1 and AT2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):85-90. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.11.008; 10.1016/j.bbrc.2009.11.008.
31. Horiuchi M, Hayashida W, Akishita M, et al. Stimulation of different subtypes of angiotensin II receptors, AT1 and AT2 receptors, regulates STAT activation by negative crosstalk. *Circ Res*. 1999;84(8):876-882.
32. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*. 2010;55(4):924-931. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147843; 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.147843.
33. Herrera M, Garvin JL. Angiotensin II stimulates thick ascending limb NO production via AT(2) receptors and Akt1-dependent nitric-oxide synthase 3 (NOS3) activation. *J Biol Chem*. 2010;285(20):14932-14940. doi: 10.1074/jbc.M110.109041; 10.1074/jbc.M110.109041.
34. Passos-Silva DG, Verano-Braga T, Santos RA. Angiotensin-(1-7): Beyond the cardio-renal actions. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(7):443-456. doi: 10.1042/CS20120461; 10.1042/CS20120461.
35. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: Nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*. 2001;18(4):247-256.
36. Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003;89(1):3-9. doi: 10.1079/BJN2002763.
37. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem*. 1999;274(4):1865-1868.
38. Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(4):267-277. doi: 10.1038/nrm782.
39. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*. 2007;5(4):237-252. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.
40. Stuart CA, Wen G, Gustafson WC, Thompson EA. Comparison of GLUT1, GLUT3, and GLUT4 mRNA and the subcellular distribution of their proteins in normal human muscle. *Metabolism*. 2000;49(12):1604-1609. doi: 10.1053/meta.2000.18559.
41. Stuart CA, Yin D, Howell ME, Dykes RJ, Laffan JJ, Ferrando AA. Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(5):E1067-73. doi: 10.1152/ajpendo.00250.2006.
42. Olefsky JM, Garvey WT, Henry RR, Brillon D, Matthaei S, Freidenberg GR. Cellular mechanisms of insulin resistance in non-insulin-dependent (type II) diabetes. *Am J Med*. 1988;85(5A):86-105.
43. Didyk RB, Anton EE, Robinson KA, Menick DR, Buse MG. Effect of immobilization on glucose transporter expression in rat hindlimb muscles. *Metabolism*. 1994;43(11):1389-1394.
44. Block NE, Menick DR, Robinson KA, Buse MG. Effect of denervation on the expression of two glucose transporter isoforms in rat hindlimb muscle. *J Clin Invest*. 1991;88(5):1546-1552. doi: 10.1172/JCI115465.

45. Ren JM, Semenkovich CF, Gulve EA, Gao J, Holloszy JO. Exercise induces rapid increases in GLUT4 expression, glucose transport capacity, and insulin-stimulated glycogen storage in muscle. *J Biol Chem*. 1994;269(20):14396-14401.
46. Hoffman NJ, Elmendorf JS. Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22(3):110-116. doi: 10.1016/j.tem.2010.12.001.
47. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346 Pt 3:561-576.
48. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-1101. doi: 10.1126/science.1106148.
49. Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): Actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005;230(9):593-605.
50. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 1998;273(22):13375-13378.
51. Wijesekara N, Konrad D, Eweida M, et al. Muscle-specific pten deletion protects against insulin resistance and diabetes. *Mol Cell Biol*. 2005;25(3):1135-1145. doi: 10.1128/MCB.25.3.1135-1145.2005.
52. Hu Z, Wang H, Lee IH, et al. PTEN inhibition improves muscle regeneration in mice fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2010;59(6):1312-1320. doi: 10.2337/db09-1155.
53. Kane S, Sano H, Liu SC, et al. A method to identify serine kinase substrates. akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *J Biol Chem*. 2002;277(25):22115-22118. doi: 10.1074/jbc.C200198200.
54. Choi K, Kim YB. Molecular mechanism of insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Korean J Intern Med*. 2010;25(2):119-129. doi: 10.3904/kjim.2010.25.2.119.
55. Prats C, Gomez-Cabello A, Hansen AV. Intracellular compartmentalization of skeletal muscle glycogen metabolism and insulin signalling. *Exp Physiol*. 2011;96(4):385-390. doi: 10.1113/expphysiol.2010.052860.
56. Pedersen O, Bak JF, Andersen PH, et al. Evidence against altered expression of GLUT1 or GLUT4 in skeletal muscle of patients with obesity or NIDDM. *Diabetes*. 1990;39(7):865-870.
57. Ciaraldi TP, Abrams L, Nikoulina S, Mudaliar S, Henry RR. Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2820-2827. doi: 10.1172/JCI118352.
58. Garvey WT, Maianu L, Zhu JH, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest*. 1998;101(11):2377-2386. doi: 10.1172/JCI11557.
59. Henriksen EJ, Diamond-Stanic MK, Marchionne EM. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(5):993-999. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.005.

60. Loh K, Deng H, Fukushima A, et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. *Cell Metab.* 2009;10(4):260-272. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.009.
61. Bjornholm M, Kawano Y, Lehtihet M, Zierath JR. Insulin receptor substrate-1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after in vivo insulin stimulation. *Diabetes.* 1997;46(3):524-527.
62. Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 1999;104(6):733-741. doi: 10.1172/JCI6928.
63. Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes.* 1998;47(8):1281-1286.
64. Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with type II diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1999;42(7):819-825. doi: 10.1007/s001250051232.
65. Kim YB, Peroni OD, Franke TF, Kahn BB. Divergent regulation of Akt1 and Akt2 isoforms in insulin target tissues of obese Zucker rats. *Diabetes.* 2000;49(5):847-856.
66. Lee DH, Shi J, Jeoung NH, et al. Targeted disruption of ROCK1 causes insulin resistance in vivo. *J Biol Chem.* 2009;284(18):11776-11780. doi: 10.1074/jbc.C900014200.
67. Julius S, Weber MA, Kjeldsen SE, et al. The valsartan antihypertensive long-term use evaluation (VALUE) trial: Outcomes in patients receiving monotherapy. *Hypertension.* 2006;48(3):385-391. doi: 10.1161/01.HYP.0000236119.96301.f2.
68. NAVIGATOR Study Group, McMurray JJ, Holman RR, et al. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2010;362(16):1477-1490. doi: 10.1056/NEJMoa1001121; 10.1056/NEJMoa1001121.
69. Barzilay JI, Davis BR, Cutler JA, et al. Fasting glucose levels and incident diabetes mellitus in older nondiabetic adults randomized to receive 3 different classes of antihypertensive treatment: A report from the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). *Arch Intern Med.* 2006;166(20):2191-2201. doi: 10.1001/archinte.166.20.2191.
70. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. the heart outcomes prevention evaluation study investigators. *N Engl J Med.* 2000;342(3):145-153. doi: 10.1056/NEJM200001203420301.
71. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: The captopril prevention project (CAPPP) randomised trial. *Lancet.* 1999;353(9153):611-616.

72. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: The CHARM-overall programme. *Lancet*. 2003;362(9386):759-766.
73. Shindler DM, Kostis JB, Yusuf S, et al. Diabetes mellitus, a predictor of morbidity and mortality in the studies of left ventricular dysfunction (SOLVD) trials and registry. *Am J Cardiol*. 1996;77(11):1017-1020.
74. Devereux RB, Dahlof B, Gerdts E, et al. Regression of hypertensive left ventricular hypertrophy by losartan compared with atenolol: The losartan intervention for endpoint reduction in hypertension (LIFE) trial. *Circulation*. 2004;110(11):1456-1462. doi: 10.1161/01.CIR.0000141573.44737.5A.
75. Jandeleit-Dahm KA, Tikellis C, Reid CM, Johnston CI, Cooper ME. Why blockade of the renin-angiotensin system reduces the incidence of new-onset diabetes. *J Hypertens*. 2005;23(3):463-473.
76. Zhou MS, Schulman IH, Zeng Q. Link between the renin-angiotensin system and insulin resistance: Implications for cardiovascular disease. *Vasc Med*. 2012;17(5):330-341. doi: 10.1177/1358863X12450094; 10.1177/1358863X12450094.
77. Lee MH, Song HK, Ko GJ, et al. Angiotensin receptor blockers improve insulin resistance in type 2 diabetic rats by modulating adipose tissue. *Kidney Int*. 2008;74(7):890-900. doi: 10.1038/ki.2008.313; 10.1038/ki.2008.313.
78. Shiuchi T, Iwai M, Li HS, et al. Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension*. 2004;43(5):1003-1010. doi: 10.1161/01.HYP.0000125142.41703.64.
79. Wei Y, Sowers JR, Clark SE, Li W, Ferrario CM, Stump CS. Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF-kappaB activation via NADPH oxidase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(2):E345-51. doi: 10.1152/ajpendo.00456.2007.
80. Wei Y, Sowers JR, Nistala R, et al. Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells. *J Biol Chem*. 2006;281(46):35137-35146. doi: 10.1074/jbc.M601320200.
81. Huan Y, Deloach S, Keith SW, Goodfriend TL, Falkner B. Aldosterone and aldosterone: Renin ratio associations with insulin resistance and blood pressure in african americans. *J Am Soc Hypertens*. 2012;6(1):56-65. doi: 10.1016/j.jash.2011.09.005; 10.1016/j.jash.2011.09.005.
82. Kumagai E, Adachi H, Jacobs DR, Jr, et al. Plasma aldosterone levels and development of insulin resistance: Prospective study in a general population. *Hypertension*. 2011;58(6):1043-1048. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180521; 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180521.
83. Catena C, Colussi G, Di Fabio A, et al. Mineralocorticoid antagonists treatment versus surgery in primary aldosteronism. *Horm Metab Res*. 2010;42(6):440-445. doi: 10.1055/s-0029-1246185; 10.1055/s-0029-1246185.
84. Lastra G, Dhuper S, Johnson MS, Sowers JR. Salt, aldosterone, and insulin resistance: Impact on the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2010;7(10):577-584. doi: 10.1038/nrcardio.2010.123; 10.1038/nrcardio.2010.123.

85. Wada T, Ohshima S, Fujisawa E, Koya D, Tsuneki H, Sasaoka T. Aldosterone inhibits insulin-induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology*. 2009;150(4):1662-1669. doi: 10.1210/en.2008-1018; 10.1210/en.2008-1018.
86. Luther JM, Luo P, Kreger MT, et al. Aldosterone decreases glucose-stimulated insulin secretion in vivo in mice and in murine islets. *Diabetologia*. 2011;54(8):2152-2163. doi: 10.1007/s00125-011-2158-9; 10.1007/s00125-011-2158-9.
87. Solomon SD, Appelbaum E, Manning WJ, et al. Effect of the direct renin inhibitor aliskiren, the angiotensin receptor blocker losartan, or both on left ventricular mass in patients with hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2009;119(4):530-537. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.826214; 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.826214.
88. Parving HH, Persson F, Lewis JB, Lewis EJ, Hollenberg NK, AVOID Study Investigators. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2008;358(23):2433-2446. doi: 10.1056/NEJMoa0708379; 10.1056/NEJMoa0708379.
89. Oparil S, Yarows SA, Patel S, Fang H, Zhang J, Satlin A. Efficacy and safety of combined use of aliskiren and valsartan in patients with hypertension: A randomised, double-blind trial. *Lancet*. 2007;370(9583):221-229. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61124-6.
90. Ingelfinger JR. Aliskiren and dual therapy in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2008;358(23):2503-2505. doi: 10.1056/NEJMe0803375; 10.1056/NEJMe0803375.
91. Jensen C, Herold P, Brunner HR. Aliskiren: The first renin inhibitor for clinical treatment. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(5):399-410. doi: 10.1038/nrd2550; 10.1038/nrd2550.
92. Lastra G, Habibi J, Whaley-Connell AT, et al. Direct renin inhibition improves systemic insulin resistance and skeletal muscle glucose transport in a transgenic rodent model of tissue renin overexpression. *Endocrinology*. 2009;150(6):2561-2568. doi: 10.1210/en.2008-1391; 10.1210/en.2008-1391.
93. Marchionne EM, Diamond-Stanic MK, Prasonnarong M, Henriksen EJ. Chronic renin inhibition with aliskiren improves glucose tolerance, insulin sensitivity, and skeletal muscle glucose transport activity in obese Zucker rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012;302(1):R137-42. doi: 10.1152/ajpregu.00448.2011; 10.1152/ajpregu.00448.2011.
94. Zierath JR. In vitro studies of human skeletal muscle: Hormonal and metabolic regulation of glucose transport. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1995;626:1-96.
95. Koistinen HA, Galuska D, Chibalin AV, et al. 5-amino-imidazole carboxamide riboside increases glucose transport and cell-surface GLUT4 content in skeletal muscle from subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(5):1066-1072.
96. Kuoppamaa H, Skrobuk P, Sihvo M, et al. Globular adiponectin stimulates glucose transport in type 2 diabetic muscle. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24(7):554-562. doi: 10.1002/dmrr.883; 10.1002/dmrr.883.